

51

Int. Cl. 2:

**C 12 D 13/00**

D 21 C 5/00

19 **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**DEUTSCHES**



**PATENTAMT**

**DE 27 46 873 A 1**

11

# **Offenlegungsschrift 27 46 873**

21

Aktenzeichen: P 27 46 873.1

22

Anmeldetag: 19. 10. 77

43

Offenlegungstag: 27. 4. 78

30

Unionspriorität:

32 33 31

20. 10. 76 V.St.v.Amerika 734324

54

Bezeichnung: Biologischer Abbau von Lignocellulose

71

Anmelder: General Electric Co., Schenectady, N.Y. (V.St.A.)

74

Vertreter: Schüler, H., Dipl.-Chem. Dr. rer.nat., Pat.-Anw., 6000 Frankfurt

72

Erfinder: Rosenberg, Steven Loren, Schenectady, N.Y. (V.St.A.)

**DE 27 46 873 A 1**

Patentansprüche

1. Verfahren zum Abbauen von Lignocellulose, g e k e n n -  
z e i c h n e t d u r c h folgende Stufen:  
Herstellen eines Lignocellulosesubstrates, das mit einer  
NährmineralLösung mit einem pH-Wert von 4 bis 5 getränkt  
ist, wobei das Substrat aus etwa 10 bis etwa 80 Gew.-%  
Lignocellulose-Feststoffen, bezogen auf die Gesamtmenge  
aus Lignocellulose-Feststoffen und Nährlösung besteht,  
Inoculieren des Substrates mit Chrysosporium pruinosa und  
Halten des inoculierten Substrates bei einer Temperatur  
von etwa 20 bis etwa 45°C, um das Chrysosporium pruinosa  
zu züchten, das Enzymsysteme erzeugt, die die Lignocellulose  
abbauen, daß man dann auf 50 bis 70°C erhitzt, bei welcher  
Temperatur das Chrysosporium pruinosa zu wachsen aufhört,  
der Abbau der Lignocellulose jedoch weitergeht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n -  
z e i c h n e t, daß das Lignocellulosesubstrat mit  
einer flüssigen Suspension von Sporen des Chrysosporium  
pruinosa inoculiert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n -  
z e i c h n e t, daß das Substrat aus 20 Gew.-% Ligno-  
cellulose-Feststoffen, bezogen auf die Gesamtmenge aus  
Lignocellulosefeststoffen und Nährlösung zusammengesetzt  
ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n -  
z e i c h n e t, daß das inoculierte Substrat zum Züchten  
des Chrysosporium pruinosa bei einer Temperatur von etwa  
38 bis etwa 40°C gehalten wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n -  
z e i c h n e t, daß die erhöhte Temperatur zwischen  
50 und 60°C liegt.

809817/0797

ORIGINAL INTENDED

Dr. rer. nat. Horst Schüler  
PATENTANWALT

2

2746873

6000 Frankfurt/Main 1, 18. Okt. 1977  
Kaiserstraße 41 Dr. Sb./he.  
Telefon (0611) 235555  
Telex: 04-16759 mapat d  
Postscheck-Konto: 282420-602 Frankfurt-M.  
Bankkonto: 225/0389  
Deutsche Bank AG, Frankfurt/M.

4389-RD-9470

GENERAL ELECTRIC COMPANY  
1 River Road  
Schenectady, N.Y./U.S.A.

Biologischer Abbau von Lignocellulose

Die Erfindung betrifft die biologische Vorbehandlung von Lignocellulose-Materialien, um das Lignin zumindest teilweise zu entfernen.

Der größte Teil des auf der Erde anfallenden, wieder aufzuarbeitenden organischen Materials besteht aus Lignocellulose. Der Celluloseteil dieses Materials ist ein lineares Glucosepolymer, und in reiner oder relativ reiner Form kann es in eine Vielzahl brauchbarer Produkte umgewandelt werden, wie Papier, Fleisch, Milch, Zucker, Äthanol und Methan. Ausgenommen in Form von Baumwolle und einigen bakteriellen Polymeren tritt Cellulose natürlich nicht in reiner Form auf, sondern ist im Gewebe von Landpflanzen vorhanden, und zwar komplexiert mit niedermolekularen, alkalilöslichen Polysacchariden, die insgesamt als Hemicellulosen bezeichnet werden, und mit Lignin, das ein hochmolekulares, dreidimensionales regelloses Polymer von Phenylpropanalkoholen ist.

809817/0797

Lignin schützt die Cellulose vor der enzymatischen Hydrolyse zu löslichen Zuckern. Je größer der Ligningehalt der Lignocellulose ist, umso beständiger ist die Cellulosekomponente gegenüber einem enzymatischen Eingriff.

Cellulose kann physikalisch vom Lignin befreit werden, z.B. durch feines Mahlen und durch chemische Extraktion bei erhöhten Temperaturen, doch sind beide Verfahren relativ zum Wert des Endproduktes teuer.

Es ist zwar gezeigt worden, daß eine Anzahl von Schimmelarten Lignin enzymatisch abbaut, doch war ihr kommerzieller Einsatz nicht gegeben, weil sie so langsam wachsen. Es werden üblicherweise zwei oder mehr Monate benötigt, um den Abbau von 50 % des Lignins in einem holzartigen Substrat zu bewirken. Die bisher bekannten, ligninabbauenden Schimmelarten sind als mesophil beschrieben worden, d.h. sie wachsen am besten bei Temperaturen zwischen 20 und 30°C.

Die vorliegende Erfindung benutzt nun einen thermostabilen Schimmel, der Lignin rasch abbaut. Es wurde auch festgestellt, daß das Lignin nur unter Dampf - im Gegensatz zum untergetauchten Zustand - merklich abgebaut wird.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird die Lignocellulose von Lignin befreit und die Cellulose dadurch dem fermentativen Abbau zugänglich.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird der thermostabile Schimmel Chrysosporium pruinosum, der von der amerikanischen Kultursammelstelle in Rockville, Maryland, USA, erhalten wurde, eingesetzt. Der Schimmel Chrysosporium pruinosum wurde als Äquivalent zu den thermostabilen Schimmeln Phanerochaete chrysosporium und Sporotrichum pulverulentum angesehen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Abbauen von Lignocellulose umfaßt das Herstellen eines Substrates, das aus Lignocellulose zusammengesetzt ist, die mit Nährminerallösung befeuchtet wurde, deren pH-Wert zwischen 4 und 5 liegt. Das Substrat besteht

zu etwa 10 bis etwa 80 Gew.-% aus Lignocellulose-Feststoffen, bezogen auf die Gesamtmenge aus Lignocellulose-Feststoffen und Nährlösung. Das getränkte Substrat wird mit *Chrysosporium pruinosum* inoculiert, und das inoculierte Substrat bei einer Temperatur von etwa 20 bis etwa 45°C gehalten, um das *Chrysosporium pruinosum* wachsen zu lassen, das Enzymsysteme erzeugt, die Lignocellulose abbauen, dann erhöht man die Temperatur auf 50 bis 70°C, bei der das Wachstum von *Chrysosporium pruinosum* aufhört, bei der aber der Lignocelluloseabbau deutlich weitergeht.

Beispielhaft für die Lignocellulosematerialien, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können, sind Holz, Mistfasern, Papier, Stroh und landwirtschaftliche Abfälle. Das Lignocellulosematerial wird vorzugsweise mit einer geeigneten Vorrichtung gemahlen, und zwar bevorzugt zu einer Teilchengröße von weniger als 5 mm, um die Oberfläche zu vergrößern und die Abbaugeschwindigkeit merklich oder beträchtlich zu erhöhen. Je mehr Oberfläche die Lignocellulose hat, umso rascher dringt das Schimmelmycel ein.

Die im Einzelfalle benutzte Nährminerallösung ist nicht kritisch, ausgenommen, daß sie einen pH-Wert von 4 bis 5 haben muß, um das Wachsen des Schimmels zu begünstigen. Die Lösung besteht aus einer Reihe von Mineralien, die die Hauptnährionen, wie Natrium, Kalium, Phosphat, Sulfat, Magnesium und Eisen zur Verfügung stellen, und sie enthält üblicherweise ein organisches, chelatbildendes Mittel, um Eisen am Ausfallen zu hindern, und sie enthält weiter Thiamin, das für das Wachstum von *Chrysosporium pruinosum* ein notwendiges Vitamin ist. Letzteres gibt man jedoch nur dann zu der Nährlösung hinzu, wenn es nicht bereits oder nicht ausreichend im Lignocellulosematerial vorhanden ist. Die absoluten Konzentrationen der Nährstoffe in der Lösung sind nicht kritisch, solange angemessene Mengen für das Wachstum der *Chrysosporium pruinosum*-Zellen vorhanden sind, doch darf die Konzentration nicht so hoch sein, daß sie das Wachstum hindert. Bakteriologische Standardmedien sind als Nährminerallösung brauchbar, da sie alle für das Schim-

melwachstum notwendigen Haptionen enthalten und die genaue Formulierung des Mediums in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der jeweiligen Lignocellulose modifiziert werden kann, d.h. zu dem Ausmaß, zu dem die Nährstoffe bereits im Lignocellulosematerial vorhanden sind.

Zur Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Lignocellulosematerial mit der Nährstofflösung befeuchtet, um ein Substrat zu erhalten, auf dem man den *Chrysosporium pruinosa*-Schimmel wachsen lassen kann. Dieses Befeuchten kann mittels einer Anzahl üblicher Techniken erfolgen, z.B. durch Tropfenlassen oder Sprühen der Lösung auf die Lignocellulosemasse. Liegt diese Masse in Teilchenform vor, dann kann man sie mit der Nährlösung vermischen. Nach Zugabe der Lösung zur Lignocellulosemasse gestattet man für eine kurze Zeitdauer die Äquilibration der Lösung, d.h. die Verteilung der Lösung durch die Masse.

Man bringt die Lignocellulosemasse mit einer solchen Menge Nährlösung in Berührung, daß das angefeuchtete Substrat zu etwa 10 bis etwa 80 Gew.-% aus Lignocellulose-Feststoffen besteht, bezogen auf die Gesamtmenge aus Lignocellulose-Feststoffen und Nährminerallösung. Bei Mengen von weniger als 10 Gew.-% an Lignocellulose-Feststoffen erhält man keinen merklichen Abbau des Lignins, während bei mehr als 80 Gew.-% Lignocellulose-Feststoffen der Schimmel nicht wächst. Befriedigende Ergebnisse werden bei einer Konzentration an Lignocellulose-Feststoffen von 20 Gew.-% erhalten, d.h., bei 20 g Lignocellulose-Feststoffen in einem Gemisch aus 80 g Minerallösung und 20 g Lignocellulose-Feststoffen.

Das bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte, angefeuchtete Lignocellulosesubstrat unterscheidet sich von einem eingetauchten Substrat, bei dem üblicherweise 0,5 Gew.-%

Lignocellulose-Feststoffe vorhanden sind, bezogen auf die Gesamtmenge aus Lignocellulose-Feststoffen und Nährlösung, z.B. 0,5 g Lignocellulose-Feststoffe bei einer Mischung aus 99,5 g Nährlösung und 0,5 g Lignocellulose-Feststoffen.

Das angefeuchtete Substrat kann mit *Chrysosporium pruinosum*-Zellen oder mit Sporen solcher Zellen inoculiert werden. Das Inoculieren kann man nach einer Reihe von Techniken ausführen, die einen maximalen Kontakt zwischen den *Chrysosporium pruinosum*-Zellen und dem Substrat gestatten. Vorzugsweise werden die Sporen oder Zellen in einem flüssigen Medium suspendiert, wie Wasser, üblicherweise bei Zimmertemperatur, und man tropft oder sprüht die Suspension auf das Substrat.

Das inoculierte Substrat wird dann unter ausreichender Belüftung bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 45°C incubiert, um die *Chrysosporium pruinosum*-Zellen zu züchten. Die Inkubation kann nach einer Anzahl von Techniken ausgeführt werden, welche die erforderliche Wachstumstemperatur und die notwendige Feststoffkonzentration aufrecht erhalten, wie mittels einem Heißluftincubator oder durch Inberührungbringen des inoculierten Substrates mit strömender Heißluft. Das rascheste Wachstum des Schimmels findet bei Temperaturen von 38 bis 40°C statt.

Beim Wachsen, d.h. beim Incubieren, verbraucht der Schimmel Lignocellulose und erzeugt Enzymsysteme, die als Lignase zum Abbau des Lignins und Cellulase zum Abbau der Cellulose bezeichnet werden.

Nachdem das erwünschte Wachstum des Schimmels erreicht ist, erhöht man die Temperatur auf 50 bis 70°C. Bei dieser erhöhten Temperatur hört zwar das Schimmelwachstum auf, doch geht der Lignocelluloseabbau weiter. Für den raschesten Abbau ist eine Temperatur von 50 bis 60°C bevorzugt. Der Schimmel kann bei dieser erhöhten Temperatur das Substrat nicht mehr nutzen, doch können die Lignose- und Cellulose-Enzyme weiterarbeiten. Die

erhöhte Temperatur wird beibehalten bis eine geeignete Menge des Lignins entfernt ist. Dabei wird gleichzeitig auch Cellulose abgebaut.

Die Zeitdauer, während der das inoculierte Substrat incubiert wird, d.h. die Zeit, während der der Schimmel bei einer bestimmten Temperatur gezüchtet wird als auch die Zeit, für die das incubierte Substrat bei dieser bestimmten erhöhten Temperatur gehalten wird, ist empirisch bestimmbar und hängt vom erwünschten Abbaugrad für die jeweilige Lignocellulosemasse ab. Im besonderen kann die Temperatur nach 3-tägigem Incubieren erhöht und das incubierte Substrat z.B. 3 Tage bei dieser erhöhten Temperatur gehalten werden. Der Abbaugrad der Lignocellulosemasse kann in üblicher Weise bestimmt werden, im allgemeinen durch Bestimmen der verbliebenen Mengen an Lignin und Cellulose. Diesen Zyklus kann man wiederholen und die optimale Zeit und Temperatur zum Abbau eines bestimmten Lignocellulose-Materials graphisch bestimmt werden, damit man eine maximale Menge freier oder für Cellulase empfindlicher Cellulose erhält.

Das erhaltene Produkt, das zumindest merklich vom Lignin befreit oder abgebaut ist, kann dann als Cellulosequelle oder zuckerreiches Tierfutter oder als Fermentationssubstrat benutzt werden. Bei dem Verfahren entstehen auch lösliche Ligninderivate, die als chemische Ausgangsmaterialien brauchbar sein mögen.

Durch die bloße Anfeuchtung des Lignocellulosematerials, gegenüber dem Eintauchen, können größere Lignocellulosemengen pro Volumeneinheit der Kultur behandelt werden.

Für alle Versuche wurde *Chrysosporium pruinosum* (Gilman und Abbot) Carmichael, ATCC 24782 benutzt. Dieser Organismus wurde kürzlich als der unvollständige Zustand des Pilzes *Phanerochaete chrysosporium* identifiziert.

Als Nährmineralmedium wurde die folgende Zusammensetzung benutzt:

5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 6,04 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,85 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 10 ml einer



Lösung mit Spurenelementen sowie destilliertes Wasser auf 990 ml. Die Lösung mit den Spurenelementen hatte die folgende Zusammensetzung:

5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g  $\text{CaCl}_2$ , 5 g Versenol und destilliertes Wasser auf 250 ml. Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Einbringen in den Autoclaven durch Zugabe weniger Tropfen konzentrierter Salzsäure auf 5,0 eingestellt. Ein Bruchteil einer filtersterilisierten Lösung von Thiamin-HCl (1 mg/ml) wurde nach der Behandlung im Autoclaven zu dem Medium hinzugegeben, um eine Thiaminkonzentration von 1 µg/ml zu haben. Durch Zugabe von 40 ml einer sterilen 25 %-igen Glucoselösung zu 960 ml des heißen, sterilen Mineralmediums, das vorstehend beschrieben wurde und 15 g Agar enthielt, wurde ein Glucose/Mineral/Agar-Medium zubereitet.

Zur Herstellung des Lignosecellulosematerials wurden 200 g trockenen Mistes zu 2 l destilliertem Wasser in einem 3,785 l fassenden Waring-Mischer hinzugegeben und 15 Sekunden lang bei geringer Geschwindigkeit zerschnitten. Das Vermischen wurde dreimal wiederholt, wobei man zwischen den Mischvorgängen jeweils 15 Sekunden Pause einlegte. Dann überführte man die Suspension in ein Glasgefäß mit einem Durchmesser von 30 cm und einer Höhe von 61 cm und verdünnte 1 : 1 mit destilliertem Wasser. Diese Suspension wurde mittels eines auf variable Geschwindigkeit einstellbaren Motors, der mit einem Schaft und Propeller verbunden war, vermischt. Die Motorgeschwindigkeit wurde so eingestellt, daß das gesamte Material suspendiert war, und man rührte die Suspension 1 1/2 Stunden lang. Dann verringerte man die Mischgeschwindigkeit für 1/2 Stunde, damit sich der Sand absetzen konnte, während die leichteren Faserteilchen suspendiert blieben. Während der Motor weiter mit verringerter Geschwindigkeit in Betrieb blieb, wurden die suspendierten Teilchen durch Hebern abgezogen und auf ein Sieb mit einer lichten Maschenweite von 0,238 mm überführt. Das Material wurde auf dem Sieb mit destilliertem Wasser gewaschen. Rühren, Absetzenlassen und Sieben wurde dreimal wiederholt, und danach trocknete man die erhaltenen Fasern drei Tage bei 65°C. Die getrockneten

2746873

Fasern wurden in einer Fleischhackmaschine zerkleinert, um die Teilchen zu redispergieren, und diese Teilchen wurden in Glasgefäßen gelagert.

Die Fasern wurden in einem auf 65°C erwärmten Ofen für mindestens 2 Tage vor der Benutzung getrocknet, bis ein konstantes Gewicht erhalten wurde. Da das Material in Luft etwas hygroskopisch ist, hatte man es beim Wägen in einer abgeschlossenen Petrischale auf der Oberfläche einer 100°C heißen Platte.

Die auf diese Weise hergestellten trocknen, teilchenförmigen Mistfasern hatten eine Durchschnittsgröße von 1-3 mm in der Länge und 0,5 mm in der Breite. Die Fasern enthielten  $14 \pm 1$  Gew.-% Asche,  $37 \pm 2$  Gew.-% reduzierenden Zucker (Cellulose und Hemicellulose) und  $37 \pm 1,5$  Gew.-% Lignin.

Die vorgenannten Mengenangaben sind diejenigen, auf denen die Gew.-%-Angaben löslichen gemachten Materials in den Figuren 1 und 2 beruhen, von denen Figur 1 den Lignin- und Celluloseabbau durch *Chrysosporium pruinosum*-Schimmel auf einem untergetauchten Substrat, Figur 2 den Lignin- und Celluloseabbau durch *Chrysosporium pruinosum* auf einem getränkten Substrat und Figur 3 den Lignin- und Celluloseabbau durch wachsende und temperaturerhöhte (nicht wachsende) Kulturen von *Chrysosporium pruinosum* zeigt.

Für die Zubereitung des Inoculums wurden Kulturen von *Chrysosporium pruinosum* 5 Tage bei 38°C auf Glucosemineralagarplatten gezüchtet. 10 ml sterilen, destillierten Wassers wurden zu jeder Platte hinzugegeben, und das Oberflächenwachstum wurde mit einem Glasausbreiter leicht suspendiert. Diese Suspension, die hauptsächlich Sporen und einige Bruchstücke vegetativen Myceliums enthielt, wurde für alle Kulturen als Inoculum benutzt.

Die Kulturen wurden sowohl auf in Mineralnährlösung in Schüttelflaschen untergetauchten Substraten als auch auf angefeuchteten

809817/0787

2746873

Substraten auf der Oberfläche von Mineralagarplatten gezüchtet. Die untergetauchten Kulturen in Schüttelflaschen enthielten 50 ml Mineralmediumlösung und 50 mg trockener, gewaschener Mistfasern in 250 ml fassenden Erlenmeyerkolben. Die Kolben wurden für 20 Minuten sterilisiert und nach dem Abkühlen mit 0,1 ml der oben beschriebenen Sporensuspension inoculiert. Die Kulturen incubierte man bei 38°C und 80 % relativer Feuchtigkeit unter rotierendem Schütteln bei 230 Umdrehungen pro Minute auf einem Inkubatorschüttelgerät New Brunswick Modell G26.

Die getränkten Kulturen auf der Agaroberfläche wurden folgendermaßen zubereitet: Sterile Nukleopore-Membranfilter (5 µm Porengröße, 47 mm Durchmesser) wurden mit der matten Seite nach unten auf der Oberfläche von Petrischalen (25 x 150 mm) angeordnet, die etwa 200 ml Mineralagarmedium enthielten, das aus der Nährminerallösung, verdickt mit 1,2 Gew.-% Agar zusammengesetzt war. Pro Platte wurde ein Filter benutzt. 200 mg trockener, steriler Mistfasern wurden auf der Oberfläche jedes Filters ausgebreitet. Die 200 mg Faserproben wurden aus Pyrexrohren mit Schraubverschluß und Abmessungen von 16 x 125 ml entnommen. Dies entsprach einer 20 Gew.-%igen Feststoffkonzentration, d.h. 20 Gew.-% Fasern auf eine Mischung aus 20 Gew.-% Fasern + 80 Gew.-% Nährminerallösung. Jedes Faserhäufchen wurde an der Peripherie mit 2 Tropfen (0,1 ml) der wie oben beschriebenen Sporensuspension inoculiert, und danach die Kulturen bei 38°C incubiert. Die relative Feuchtigkeit im Incubator wurde unter Verwendung von wassergefüllten Trögen bei 80 % gehalten.

Die Bestimmungen restlicher organischer und anorganischer Bestandteile der Fasern und Faserkulturen für die Figuren 1 und 2 erfolgte folgendermaßen:

a. Für die Agarplattenkulturen (angefeuchteten Kulturen): Die Fasern oder Faser + Mycel enthaltenden Filter wurden von den Agarplatten abgenommen und die Fasermycelmatten von den Filtern abgekratzt und mit destilliertem Wasser in geteerte Tiegel gewaschen. Die Tiegel wurden bei 65°C bis zum Erreichen eines konstanten Gewichtes getrocknet und dann über Nacht in einem Ofen bei 550°C verascht. Der organische Anteil

809817/0787

wurde als das Material definiert, das bei 550°C verdampfte.

b. Schüttelkolbenkulturen (untergetauchte Kulturen):

Der Inhalt eines Paares von Schüttelkolben wurde kombiniert und durch ein Nukleoporefilter mit Porenöffnungen von 0,4 µm und 47 mm Durchmesser vakuumfiltriert, um die Festkörperteilchen zurückzuhalten. Der auf den Seiten der Kolben zurückbleibende Rest wurde mit einer geringen Menge destillierten Wassers auf das Filter gewaschen. Der filtrierte Rest wurde in die beteerten Tiegel überführt, getrocknet und wie oben beschrieben verascht.

Die Analyse auf Cellulose, Hemicellulose und Lignin für die Figuren 1, 2 und/erfolgte folgendermaßen:

Proben des unlöslichen Materials wurden wie oben beschrieben gesammelt, mit der Ausnahme, daß man sie in Glasgefäße mit einem Durchmesser von 25 mm und einer Höhe von 50 mm überführte und bei 65°C trocknete. Trockene Proben von Fasern oder Fasern + Mycel wurden mit 10 ml 72 %-iger Schwefelsäure vermischt, und man ließ das Ganze 3 Stunden stehen, wobei man jeweils stündlich einige Sekunden mischte. Das Ganze wurde dann mit destilliertem Wasser auf 50 ml verdünnt und über Nacht stehen gelassen. Jede Probe filtrierte man danach unter Verwendung eines geteerten Nucleoporefilters mit 0,4 µm Porengröße und 47 mm Durchmesser im Vakuum. Bruchteile des Filtrates wurden für Kohlenhydrat (reduzierender Zucker)-Versuche zurückbehalten. Bei diesem Versuch wurde 0,1 ml des Filtrats mit 3,9 ml eines Reagens vermischt, das 1 % Thioharnstoff und 0,05 % Anthron in 72 %-iger Schwefelsäure enthielt. Die Mischung erhitzte man für 10 Minuten auf 95°C, kühlte auf Zimmertemperatur ab und maß die optische Dichte bei 610 mµ. Glucose wurde als Standard benutzt. Diese Versuche wurden routinemäßig auf einem Autoanalysator Technicon Model AA-1 ausgeführt.

Der Rest wurde auf dem Filter mit destilliertem Wasser gewaschen, bis der Filtrat-pH-Wert 5 erreichte, was mit pH-Papier gemessen wurde. Filter + Rest wurden dann über Nacht bei 65°C getrocknet und gewogen. Filter und Proben wurden in geteerte Tiegel überführt und über Nacht bei 550°C verascht. Lignin war definiert als der Teil der Probe (ausgenommen im Filter), der verdampfte. Die Filter enthielten weniger als 0,5 mg Asche.

Für die Ergebnisse der Figur 3 wurden angefeuchtete, inoculierte Faserkulturen auf Agarplatten wie oben beschrieben zubereitet. Nach 3 Tagen wurde <sup>mit</sup> einer Reihe von Kulturen verglichen, die bei der Wachstumstemperatur von 38°C belassen worden war.

Die in den Figuren 1, 2 und 3 in Gew.-% aufgetragenen löslich gemachten Bestandteile beruhen auf dem ursprünglichen Gehalt der Faserprobe.

Die Figur 1 veranschaulicht den Abbau der Bestandteile der Mistfasern durch *Chrysosporium pruinosum*, das in untergetauchten Kulturen in Schüttelkolben gewachsen ist. Jeder Punkt repräsentiert den kombinierten Inhalt zweier Schüttelkolben. Einzelne Punkte zeigen, daß die wiederholten Proben identische Werte ergaben. Die gestrichelten Linien gelten für die nicht inoculierten Vergleichsproben.

Figur 1 zeigt den Verlust an verschiedenen Faserbestandteilen mit der Zeit in untergetauchten Kulturen, und es ergibt sich, daß unter diesen Bedingungen durch *Chrysosporium pruinosum* wenig oder kein Lignin löslich gemacht, d.h. abgebaut wird, verglichen mit den nicht inoculierten Kontrollproben, und dies während einer Zeit von 30 Tagen aktiven Abbaus. Während dieser Zeit wurden 50 % der Kohlehydrate (Cellulose und Hemicellulose) und 40 % der gesamten organischen Bestandteile löslich gemacht.

Figur 2 zeigt den Abbau der Mistfaser-Bestandteile durch *Chrysosporium pruinosum*, das in getränkten Fasern auf der Oberfläche von Mineralagarplatten gezüchtet wird. Jeder Punkt repräsentiert den Inhalt einer Platte. Alle Versuche wurden doppelt ausgeführt. Die gestrichelten Linien gelten für die nicht inoculierten Vergleichsproben.

Figur 2 zeigt den Verlust an verschiedenen Faserkomponenten mit der Zeit in getränkten Faserkulturen auf der Oberfläche von Mineralagarplatten und zeigt, daß ein Abbau von Lignocellulose vorzugsweise auf nicht untergetauchten Substraten, d.h. auf getränkten Substraten, stattfindet und daß eine Feststoffkonzentration von etwa 20 Gew.-% einen raschen Lignocelluloseabbau gestattet. Nach 12 Tagen Incubationszeit waren

809817/0797

50 % des Lignins, 80 % der Kohlehydrate (Cellulose und Hemicellulose) und 75 % der gesamten organischen Bestandteile löslich gemacht. Nach dieser Zeit scheint der Abbau aufzuhören. Unter den vorstehenden Bedingungen wird in den nicht inoculierten Vergleichsproben weniger Material löslich gemacht als in den Schüttelkolben.

In der folgenden Tabelle ist ein Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten für Lignin und Cellulose durch *Polyporus versicolor*, einen gut untersuchten, ligninabbauenden, mesophilen Schimmel und durch *Chrysosporium pruinsum*, den in der vorliegenden Erfindung benutzten, ligninabbauenden, thermostabilen Schimmel angegeben.

TABELLE

<u>Organismus</u>	<u>Abgebaute Cellulose(%)</u>	<u>Zeit (Tage)</u>	<u>Abgebautes Lignin (%)</u>	<u>Zeit (Tage)</u>
<i>P. versicolor</i> (a)	76	245	50	168
<i>C. pruinsum</i>	80-90	12	50	12

(a) E.B. Cowling, Comparative Biochemistry Of The Decay Of Sweetgum Sapwood By White - Rot and Brown - Rot Fungi. U.S.D.A. tech. Bull No. 1258, (1961).

Figur 3 zeigt, daß ein deutlicher Abbau von Lignin und Cellulose bei einer Temperatur von 55°C weitergeht, d.h. bei einer Temperatur, bei der der Schimmel nicht wachsen kann.

Die Angaben der vorstehenden Tabelle zeigen, daß unter geeigneten Kulturbedingungen genug Lignin biologisch entfernt werden kann, um 85 bis 90 % der Cellulose durch Cellulase abbaubar zu machen. Die Geschwindigkeit und Ausbeuten für den Celluloseabbau nach Figur 2 sind Minimalwerte, da die Zellwandzuckerreste zu den erhaltenen Cellulosewerten beitragen und die Kulturen von kleinen Sporeninocula ausgingen. Unter Verwendung eines größeren Inoculums von Cellulase und Lignase, das durch vegetative Zellen eingeführt wird, d.h. den *Chrysosporium pruinsum*-Schimmel, würde vermutlich die für den maximalen Celluloseabbau erforderliche Incubationszeit verkürzt.

Figur 3 zeigt, daß trotz des Erhitzens der Zellen auf Temperaturen, bei denen sie nicht wachsen können ( $55^{\circ}\text{C}$ ), der enzymatische Abbau von Lignin und Cellulose bei Abwesenheit lebensfähiger Zellen weiterging. Aus Cellulase-Studien ergab sich, daß die optimale Cellulaseaktivität oberhalb von  $55^{\circ}\text{C}$  liegt. Dies zeigt, daß bei der Temperaturerhöhung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren der Zellmetabolismus beendet und die Verzuckerung fortgesetzt wird.

Figur 2 zeigt, daß deutliche Mengen an Lignin abgebaut werden können und daß 80 bis 90 % des Cellulosegehaltes des Substrates der Einwirkung von Cellulaseenzymen ausgesetzt werden können. Die bei den Versuchen benutzten Mistfasern waren gegenüber anderen natürlichen organischen Materialien relativ ligninreich. Die Celluloseabbaubarkeit ist umgekehrt proportional dem Ligningehalt, und dies läßt vermuten, daß die Abbaufähigkeit des beim erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten thermobeständigen Schimmels, die auf einem widerstandsfähigen Substrat, wie Mistfasern, vorhanden war, bei Substraten mit weniger Ligningehalt, wie Holz, gleich oder besser sein sollte. Weitere Versuche haben tatsächlich einen guten Lignin- und Celluloseabbau bei Zeitungspapier als Wachstumssubstrat gezeigt. Zeitungspapier wird zum großen Teil aus ligninhaltigen Holzfasern hergestellt.

In einer am gleichen Tage eingereichten anderen deutschen Patentanmeldung der Anmelderin, für die die Priorität der US-Patentanmeldung Serial No. 734 325 vom 20. Oktober 1976 in Anspruch genommen ist, wird das Züchten eines thermobeständigen Schimmels auf einem getränkten Lignocellulosesubstrat bei einer Temperatur von  $20^{\circ}\text{C}$  bis  $45^{\circ}\text{C}$  offenbart, wobei der Schimmel Enzyme produziert, die das Substrat abbauen.

2746873

-17-

Nummer:

27 46 873

Int. Cl. 2:

C 12 D 13/00

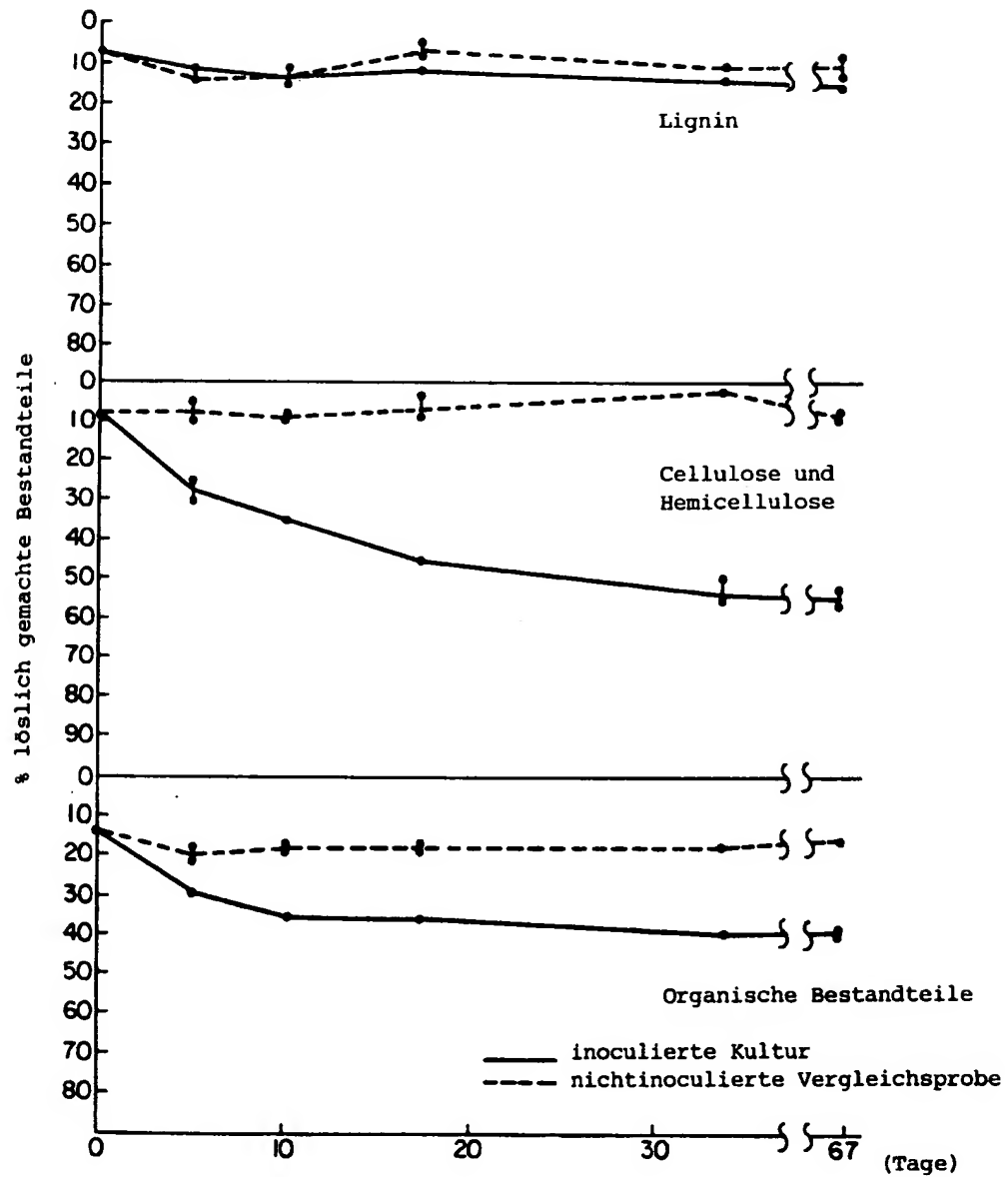
Anmeldetag:

19. Oktober 1977

Offenlegungstag:

27. April 1978

FIG. 1



809817/0797



FIG. 2

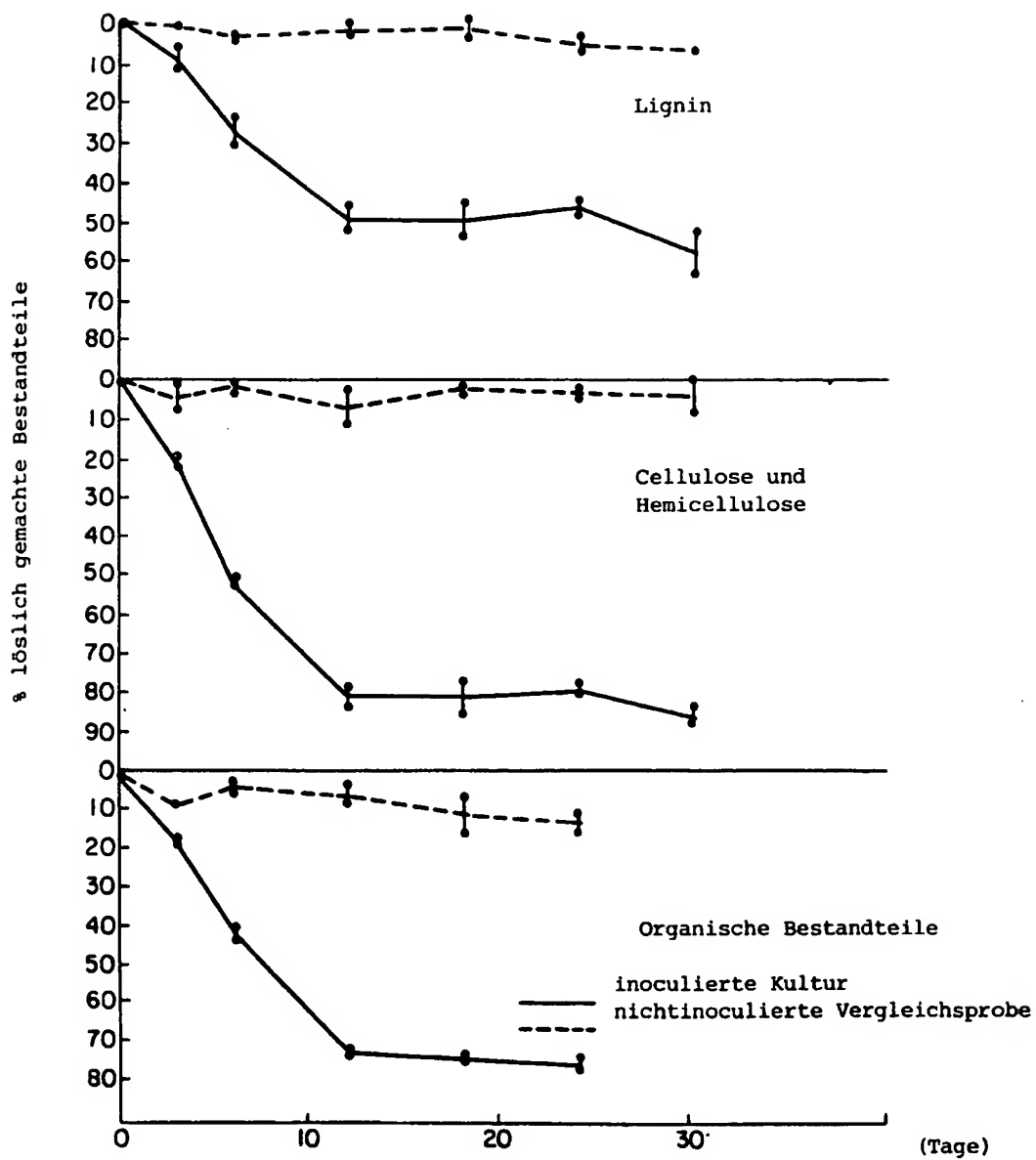
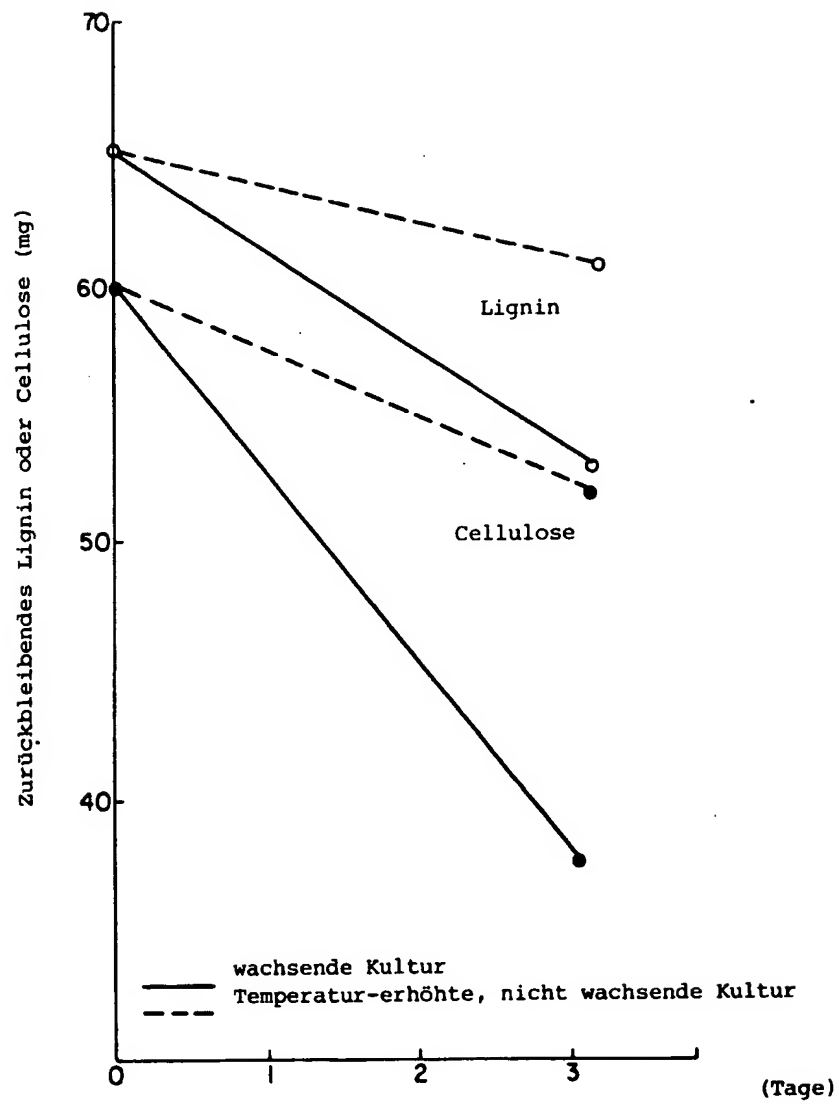


FIG. 3



809817/0797